

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-122895

(43)Date of publication of application : 08.05.2001

(51)Int.Cl.

C07K 5/087

A61K 38/00

A61P 25/04

(21)Application number : 11-298513

(71)Applicant : HAMARI CHEMICALS LTD

(22)Date of filing : 20.10.1999

(72)Inventor : OKADA YOSHIO  
TAKAHASHI MOTOHIRO

## (54) NEW DERIVATIVE OF OPIOID PEPTIDE

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a low molecular weight derivative of opioid peptide having high affinity to an opioid receptor, exhibiting an excellent analgesic effect.

SOLUTION: The peptide derivative is expressed by general formula (T): X-Pro-Phe-NH-Y [X is dimethyltyrosine, Y is: a (substituted) quinolyl or isoquinolyl residue]. The peptide derivative of general formula (I) manifests a high specific affinity to  $\mu$ -opioid receptor and exhibits an excellent analgesic effect. A new analgetic drug is expectable because a peptide derivative of general formula (I) manifesting  $\mu$ -receptor agonist activity and  $\kappa$ -receptor antagonist activity exhibits an excellent analgesic effect and is expectable of reducing side effects observed in the conventional opioid compound.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-122895

(P2001-122895A)

(43) 公開日 平成13年5月8日(2001.5.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 0 7 K 5/087		C 0 7 K 5/087	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 25/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/04		A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平11-298513

(22) 出願日 平成11年10月20日(1999. 10. 20)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年10月16日  
日本薬学会近畿支部発行の「第49回日本薬学会近畿支部  
総会・大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000236573

浜理薬品工業株式会社

大阪府大阪市東淀川区柴島1丁目4番29号

(72) 発明者 岡田 芳男

兵庫県明石市朝霧台3776番地の122

(72) 発明者 高橋 源浩

兵庫県神戸市中央区生田町1-3-12 ダ  
イアパレス新神戸304号

(74) 代理人 100062498

弁理士 竹内 卓 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なオピオイドペプチド誘導体

(57) 【要約】

【目的】 オピオイドレセプターに対して高い親和性を示し、優れた鎮痛効果を発揮する低分子量のオピオイドペプチド誘導体を提供すること。

【構成】 一般式 (I) のペプチド誘導体：

X-Pro-Phe-NH-Y (I)

[式中、Xは、ジメチルチロシンを表し、またYは、置換又は未置換のキノリル又はイソキノリル残基を表す]。

【効果】 一般式 (I) のペプチド誘導体は、特にμ-オピオイドレセプターに対して高い特異的親和性を示し、優れた鎮痛効果を発揮する。またμ-レセプターアゴニスト活性とδ-レセプターアンタゴニスト活性を示す一般式 (I) のペプチド誘導体は、優れた鎮痛効果を発揮ししかも従来公知のオピオイド化合物が有する副作用を低減できることが予想されるので、新しい鎮痛薬として期待できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)によって表される、 $\mu$ -オピオイドレセプターに対して高い特異的親和性を示すペプチド誘導体またはその塩。



【式中、Xは、ジメチルチロシンを表したYは、置換又は未置換のキノリル又はイソキノリル残基を表す】。

【請求項2】  $\mu$ -オピオイドレセプターアゴニスト活性と $\delta$ -オピオイドレセプターアンタゴニスト活性とを併せて有する、請求項1において記載された、一般式

(1)で表されるペプチド誘導体又はその塩。

【請求項3】 請求項1において記載された、一般式

(1)によって表されるペプチド誘導体またはその塩を

一種又は二種以上有効成分として含んで成る医薬品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する分野】 本発明は、オピオイドレセプターを介して優れた生理活性作用を有し、特に $\mu$ -オピオイドレセプターに低濃度で親和性を示す新規なペプチド誘導体およびその塩に係わる。更には、 $\mu$ -オピオイドレセプターアゴニスト活性と $\delta$ -オピオイドレセプターアンタゴニスト活性とを併せて有する新規なペプチド誘導体またはその塩および前記した新規なペプチド誘導体を一種又は二種以上有効成分として含んで成る医薬品に係わる。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ペプチドは、単位構造であるアミノ酸の配列により様々な生理活性を示すことが知られている。またペプチドを構成するアミノ酸を、他のアミノ酸または置換基等に変換することによりペプチドミメティクスとし、得られた化合物は固有の異なる生理活性を示す。脳内に存在する生理活性ペプチドとして、鎮痛効果等に関わっているエンケファリン(Enkephalin; Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)等、オピオイドと総称されるペプチドについては多くの研究がなされており、その過程でオピオイドおよびオピオイド構造を模したオピオイドミメティクスについては多くの研究もまたなされている。鎮痛効果の発現は、リガンドレセプター間の相互作用によることが報告されている。オピオイドレセプター作用物質としては、従来からモルヒネが広く知られており、その類縁体であるオピオイド(モルヒネ様)鎮痛剤が、がん性疼痛および皮膚移植や水痘・帯状疱疹発症後の激しい痛みを抑えるために臨床的に使用されている。しかしながら、呼吸中枢抑制作用などの中枢神経抑制作用、消化管の平滑筋緊張や耽溺性、耐性など副作用も重篤であり、一層改善された鎮痛剤の開発が、特に強度の痛みをもたらすがん末期、帯状疱疹における疱疹後痛の症例等多く分野で強く要請されている。

【0003】 最近ウシ大脳皮質から $\mu$ オピオイドレセプター

に対して選択的に結合する内因性アゴニストとしてエンドモルフィンが発見され、マウスにおいて強力かつ持続性の鎮痛効果を有することが報告された(J. E. Zadinaら、Nature、386 499-502 (1997))。従来哺乳動物の脳内から発見された、エンケファリン、ダイノルフィンなど内因性オピオイドペプチドはいずれも $\delta$ -および $\kappa$ -オピオイドレセプター結合性であることから、モルヒネが有する耽溺性や耐性発現などの欠点のない新しい鎮痛化合物として期待されている。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 上記した事情に鑑みて、本発明者らは、鎮痛効果発現の作用機序を明らかにし且つ改善された新規鎮痛剤を開発するべく、鎮痛効果を有する新たなペプチド構造物について体系的な探索と研究を行った。

【0005】 オピオイドレセプターに特異的に結合する内因性オピオイドペプチドがこれまでに、種々の哺乳動物の中枢系や末梢組織において発見されているが、まず上記した新規ペプチドの探索に際しては、鎮痛効果など好ましい薬理作用と副作用との分離を確実にするため、構造的にはペプチド鎖長を可能な限り短縮し、ペプチド構造を単純化することを基本方針とした。そこで出発ペプチド構造として Tyr-Pro-Phe-を選択し、このものを種々な化学的修飾に供して、ペプチド誘導体又は類縁体を合成し、これらについてマウス脳由来オピオイド受容体を用いたレセプター競合アッセイを行うことによってオピオイド受容体親和性を測定し、更にオピオイド受容体親和性が特異的に高いペプチド誘導体について、Tail pressure法によって鎮痛効果を測定した。その結果、下記一般式(1)によって表されるペプチド誘導体が $\mu$ -オピオイドレセプターに対して高い特異的親和性を示し、従って強力な鎮痛効果を発揮することを見出して、本発明を完成したものである。

【0006】 即ち、本発明は、下記一般式(1)によって表される、 $\mu$ -オピオイドレセプターに対して高い特異的親和性を示すペプチド誘導体又はその塩、更には $\mu$ -オピオイドレセプターアゴニスト活性と $\delta$ -オピオイドレセプターアンタゴニスト活性とを併せて有するペプチド誘導体又はその塩並びにかかるペプチド誘導体を一種又は二種以上含んでなる医薬に係わる：



【式中Xは、2, 6-ジメチルチロシン残基を示し、またYは、置換又は未置換のキノリル又はイソキノリル残基を表す】。一般式(1)で表されるペプチド誘導体は、そのN末端からジメチルチロシン、プロリンおよびフェニルアラニンが結合して成るトリペプチドのC末端を種々の有機アミンでアミド化したものであって、ジメチルチロシンを含めこれらのアミノ酸はすべてL-体であり、またC末端をアミド化するために用いられるアミンとしては、いずれもモノアミンであって、例えば置換又

は未置換のキノリルアミン類又はイソキノリルアミン類が挙げられる。

【0007】

【発明の実施の形態】上記一般式(1)で表されるペプチド誘導体は、固相合成法又は液相合成法のいずれによっても容易に合成される。固相合成法においては、固相合成機としてPeptide synthesizer Model 433Aを使用し、またResinはFmoc-Amide Resinを用い、Fmoc-アミノ酸としてFmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Phe-OHおよびFmoc-Trp(Boc)-OHを使用して、HOBt/HBTUによる活性エステル法でカップリングし、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)でFmoc脱保護を行い、合成ペプチドをレジジンから95%TFA/H<sub>2</sub>Oにより切り出して行うのである。また液相合成においては、例えばTyr-Pro-Phe-NH-キノリン(quinoline)の場合別紙図1に示すスキームに従って行うことができる。なお、ジメチルチロシンは、Dygoら(Synthesis, 741(1991))の方法にしたがって合成することが出来る。

【0008】上記ペプチド誘導体合成法において、目的とするペプチド誘導体または中間体は、例えばイオンクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、再結晶、抽出など種々の方法を適宜に組み合わせて単離、精製すればよい。またかくして得られた一般式(1)で表されるペプチド誘導体は、定法に従って有機もしくは無機の酸または塩基を用いてそれぞれの塩に変換することが出来る。

【0009】なお合成した、一般式(1)で表されるペプチド誘導体又はその塩のオピオイド受容体への親和性は、以下のようにして行うことができる；即ち、ラット脳組織を50μg/mL soybean trypsin inhibitorを含む0.32M sucrose, 10mM HEPES (pH 7.5) でホモジナイズし、分画遠沈してシナプス膜分画(P2分画)を得、これから内在性リガンドを除去するため100mM NaCl, 0.1mM GMP, soybean trypsin inhibitorを含む50mM HEPES (pH 7.5) でプレインキュベートする。[<sup>3</sup>H]DPDPEおよび[<sup>3</sup>H]DAGOを放射性リガンドとして使用し、シナプス膜分画に吸着した放射性リガンドとの交換結合実験(Radiolabeled receptor assay; RRA)を行うのであるが、この際目的リガンドとの交換を一定条件下の下で行った後、P2分画に残存する放射線量を測定し、P2分画に吸着したリガンド量を算出するのである。即ち、放射標識リガンドと目的リガンドとの間で競合してレセプターとの結合が起こるものと仮定し、Affinity constant (K<sub>i</sub>)をChengらの方法(Y. Cheng, Biochem. Pharmacol., 22, 3099 (1973))により求める。

【0010】また鎮痛効果は、下記するTail pressure法に従って行う；即ち、実験動物としてDdY系雄性マウス(体重24~30g) 1群5匹を使用して、被験薬物を生理的食塩液に溶解した後10μl/mouseを大嚙内投与(i.c.v.)し、次いでマウスの尾根部に圧測定装置(UGO BASILE

社製)を用いて加圧下に昇圧していき、マウスがもがき反応を起こす閾値圧を測定するが、この際陽性対象薬として塩酸モルヒネを使用する。なお、投与直後に回転運動を示したマウスは解析より除外することとし、結果を閾値圧(g)の時間的経過として平均値±S.Eで表わす。

【0011】本発明に従った、一般式(1)で表されるペプチド誘導体および塩は、文献に未記載の新規化合物であり、上記した試験法において確認されたようにオピオイドレセプターに対する特異的親和性を有し、鎮痛効果など種々のモルヒネ様生理活性を発現する。

【0012】従って、本発明のペプチド誘導体は、鎮痛作用のみならずオピオイドペプチドがそのレセプターを経由して発現する種々の中枢性および末梢性応答、例えば麻酔、沈静、呼吸、脈動、消化管機能、ホルモン分泌調節、心筋収縮調節など生理学的作用を発揮することが明らかである。本発明のペプチド誘導体又はその塩は、鎮痛薬又はその他のオピオイドレセプター活性に関連した神経疾患の治療薬又は予防薬として用いることが可能であり、その場合、経口投与、非経口投与、直腸投与、舌下投与外用塗布又は脊髄管腔内の硬膜外注入やくも膜下注入など種々の投与経路によって、それぞれに適した適宜の基材、賦形剤など薬学的に許容し得る担体や添加剤と混合して医薬製剤として患者に投与することが出来る。本発明のペプチド誘導体又はその塩の投与量は、投与を必要とする患者の年齢、疾患や症状の重篤度などによって変動するが、通常は0.01ないし500mg/kg体重を一日あたり一回又は数回に分けて投与すればよい。以下において実施例を記載して本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0013】

【実施例】参考実施例：

## 2. 6-ジメチル-L-チロシンの合成

### (1) 3, 5-ジメチル-4-ヨードフェノールの合成

3, 5-ジメチルフェノール(1.0eq)を大過剰のメタノール中において塩酸を用いて塩酸塩とし次いで約40℃に加温した後、過ヨウ素酸とヨウ化カリウムを水に溶かした溶液を滴下し、そのままおぼ3時間反応させた。定法に従い反応液を処理して、3, 5-ジメチル-4-ヨードフェノールをほぼ白色の結晶として得た。m.p. 128-129℃、収率、40.8%。

### (2) 4-ヨード-3, 5-ジメチルフェニル酢酸エステルの合成

3, 5-ジメチル-4-ヨードフェノール(1.0eq)を過剰量の無水酢酸とピリジンの混液中に溶かし、約50℃に加温して2時間攪拌した。常温に冷却後、0.5NHClで稀釈して約2時間攪拌し、析出する結晶を分離して、ほぼ白色の結晶として4-ヨード-3, 5-ジメチルフェニル酢酸エステルを得た。m.p. 43℃、収率、96%。

### (3) 3-(4-アセトキシ-2, 6-ジメチルフェ

### ニル) - 2-プロピオン酸メチル (2) - 2-アセトアミドエステルの合成

4-ヨード-3, 5-ジメチルフェニル酢酸エステル (1.0eq) と過剰量の 2-アセトアミドアクリル酸メチルエステルとをそれぞれ適量のトリ-*o*-トリルホスフィン、トリエチルアミンとジアセトキシパラジウムと共に大過剰量のアセトニトリルに溶解させ、20時間 80-90°C に加熱下還流させた。触媒を除去後、反応液を減圧濃縮し、ついで水および酢酸エチルで抽出して、有機相からほぼ白色の結晶として粗製 3-(4-アセトキシ-2, 6-ジメチルフェニル) - 2-プロピオン酸メチル (2) - 2-アセトアミドエステルを得た。m. p. 153-154°C、収率、78%。次いでこの粗製 3-(4-アセトキシ-2, 6-ジメチルフェニル) - 2-プロピオン酸メチル (2) - 2-アセトアミドエステルをシリカゲルカラムを注加し、クロロホルムで溶出することによって白色の結晶として精製 3-(4-アセトキシ-2, 6-ジメチルフェニル) - 2-プロピオン酸メチル (2) - 2-アセトアミドエステルを得た。m. p. 153-154°C、収率、92%。

### (4) 4-アセトキシ-N-アセチル-2, 6-ジメチル-L-チロシンメチルエステルの合成

3-(4-アセトキシ-2, 6-ジメチルフェニル) - 2-プロピオン酸メチル (2) - 2-アセトアミドエステル (1.0eq) を二倍容量の酢酸エチルに溶解し、得られた溶液を窒素ガスで導入しつつ 20 分以上の間攪拌し、次いで (R,R) - (-) - 1, 2-ビス [(0-メトキシフェニル) (フェニル) ホスフィノ] エタン (以下 "Rh 触媒" と略称する) を添加後、反応器内をアスピレータで陰圧にしてから水素ガスを導入し、ほぼ 1 kg/cm<sup>2</sup> まで昇圧した。この減圧・水素ガス加圧のサイクル操作を 4-5 回繰り返してから、水素ガスによる加圧を過熱下に行き、最終的に水素圧 4 kg/cm<sup>2</sup>、温度 60°C として、この条件下で 9 時間還元反応を行った。反応液を常法に従って処理して、ヘキサンで結晶化すると、4-アセトキシ-N-アセチル-2, 6-ジメチル-L-チロシンメチルエステルを白色の結晶として得た。m. p. 106-108°C、収率、90-94%。

### (5) 2, 6-ジメチル-L-チロシン-塩酸塩・一水塩の合成

4-アセトキシ-N-アセチル-2, 6-ジメチル-L-チロシンメチルエステル (1.0eq) を 20 倍量の 10N 塩酸に加え、得られた溶液を加熱下に還流させた。反応の進行を確認してから、反応溶液を室温までに冷却し、析出した結晶を濾取し、デシケーターで乾燥して、2, 6-ジメチル-L-チロシン-塩酸塩・一水塩を得た。m. p. 255°C、収率、83%。なお、得られた結晶状化合物をエタノール中に溶解し、トリエチルアミンを加えると、目的とする 2, 6-ジメチル-L-チロシン (以下 "Dmt" と略記する) が得られた。

### 実施例 1:

### Dmt-Pro-Phe-NH-3-(Quinoly) (Sample No. MT-343) の合成

#### (1) Boc-Phe-NH-3-(Quinoly) の合成

Boc-Phe (1.0eq) を THF に溶解し、NEt<sub>3</sub> (1.2eq) を加えてから 10°C まで冷却した。この混合液にクロロ蠟酸イソブチル (IBCF, 1.1eq) を滴下し、-10°C で 30 分攪拌して混合酸無水物 (MA) 反応液とした。また 3-キノリルアミン (1.0eq) を DMF に溶解し -10°C にまで氷冷してアミン成分の DMF 溶液とし、この溶液に MA 反応液を滴下し、-10°C 付近に冷却後約 30 分間攪拌し、以後 0~5°C として一夜攪拌した。反応液中のアミン成分の消失を TLC で確認した後、反応液を濃縮し、得られた残渣に酢酸エチル (AcOEt) を加え、有機相を 10% クエン酸、5% 重曹水、20% 食塩水で順次洗浄した。次いで有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、残渣を石油エーテルで処理して結晶化させた。AcOEt-石油エーテルで再結晶を行い、結晶を濾取して乾燥して、目的化合物を得た。m. p. 124-125°C、[α]<sub>D</sub> = +47.16 (C=1.0, MeOH)

元素分析、C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> として：実測値、C: 70.59, H: 6.44, N: 10.74 (理論値、C: 70.57, H: 6.44, N: 10.74)。収率、75%。

#### (2) Boc-Pro-Phe-NH-3-(Quinoly) の合成

Boc-Phe-NH-3-(Quinoly) (1.0eq) に HCl/dioxane (20eq) を氷冷下で加え、攪拌して結晶を溶解させ、反応液中の Boc-Phe-3-NH-(Quinoly) を TLC でモニターしてその消失を確認した。ジエチルエーテルで結晶化し、結晶を分離後乾燥して Phe-NH-3-(Quinoly) 塩酸塩を得た。これとは別に Boc-Pro (1.0eq) を THF に溶解し、NEt<sub>3</sub> (1.2eq) を加えて -10°C まで冷却した後、IBCF (1.1eq) を滴下し、-10°C で 30 分間攪拌し、混合酸無水物 (MA) 反応液とした。Phe-NH-3-(Quinoly) 塩酸塩を DMF に溶解し、NEt<sub>3</sub> を混合液の液性が塩基性となるまで加え、-10°C に氷冷した。アミン成分の DMF 溶液に MA 反応液を滴下し、-10°C 付近で約 30 分攪拌し、以後 0~5°C で一夜攪拌した。反応液中のアミン成分の消失を TLC で確認した後、反応液を濃縮し、得られた残渣に酢酸エチル (AcOEt) を加え、有機相を 10% クエン酸、5% 重曹水、20% 食塩水で順次洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、得られた残渣を石油エーテルで処理することにより結晶化させた。AcOEt-石油エーテルで再結晶を行い、結晶を分離後乾燥して目的化合物を得た。m. p. 110-112°C、[α]<sub>D</sub> = -37.69 (C=1.0, MeOH)。元素分析、C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>・1/2H<sub>2</sub>O として：実測値、C: 67.99, H: 6.60, N: 11.20 (理論値、C: 67.69, H: 6.69, N: 11.26)。収率 80%。

#### (3) Boc-Dmt-Pro-Phe-NH-3-(Quinoly) の合成

Boc-Pro-Phe-NH-3-(Quinoly) (1.0eq) に HCl/dioxane (20eq) を氷冷下で加え、攪拌して結晶を溶解後、反応液中の Boc-Phe-NH-3-(Quinoly) をモニターして、その消失を TLC で確認した。Et<sub>2</sub>O で結晶化し、結晶を分離後乾燥

してPro-Phe-NH-3-(Quinolyl)塩酸塩を得た。Boc-ジメチルチロシンヒドラジド(Boc-Dmt-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, 1.0eq)をDMFに溶解し、得られた溶液を-10~-15°Cに冷却し、HCl/dioxane (2.5eq)、亜硝酸イソアミル(1.2eq)を加えた。ヒドラジン試薬を用いてTLCでヒドラジドの消失を確認するまで-10~-15°Cで攪拌を継続し、消失確認後NEt<sub>3</sub> (2.5eq)を加えた。Pro-Phe-NH-3-(Quinolyl)塩酸塩 (1.0eq)をDMFに懸濁し、NEt<sub>3</sub>を液性が塩基性になるまで加え、得られたDMF溶液を-10~-15°Cに冷却した後、アジド反応液を滴下し、0~5°Cで攪拌を継続した。TLCで反応の進行を確認した後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣にAcOEtを加え、有機相を10%クエン酸、5%重曹水、20%食塩水で順次洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、得られた残渣を石油エーテルで処理して結晶化し、次いでAcOEt/石油エーテルから再結晶した。結晶を分離後乾燥して、目的化合物を得た。m.p., 134-136°C,  $[\alpha]_D = -45.10$  (C=1.0, MeOH) 元素分析、C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>として：実測値、C: 68.60, H: 6.37, N: 10.00 (理論値、C: 68.90, H: 6.67, N: 10.30)。収率79%。

#### (4) Dmt-Pro-Phe-NH-NH-3-(Quinolyl)塩酸塩の合成

Boc-Dmt-Pro-Phe-NH-3-(Quinolyl) (1.0eq)にHCl/dioxane (20eq)を氷冷下で加え、攪拌して結晶を溶解後、反応液中のBoc-Dmt-Pro-Phe-NH-3-(Quinolyl)の消失をTLCで確認した。ジエチルエーテル(Et<sub>2</sub>O)で結晶化し、結晶を分離後乾燥してDmt-Pro-Phe-NH-3-(Quinolyl)塩酸塩を得た。

アミノ酸分析値：Dmt: 0.88, Pro: 1.10, Phe: 0.84 MS, C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>として：理論値、579.70。実測値、579.47

#### 実施例 2：

#### Dmt-Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl) (Sample No. MT-454)の合成

##### (1) Boc-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)の合成

Boc-Phe (1.0eq)をTHFに溶解し、NEt<sub>3</sub> (1.2eq)を加えてから10°Cまで冷却した。次いでこの混合液にクロロ酢酸イソブチル(BCF, 1.1eq)を滴下し、-10°Cで30分攪拌して混合酸無水物(MA)反応液とした。また5-イソキノリルアミン(1.0eq)をDMFに溶解し-10°Cにまで氷冷してアミン成分のDMF溶液とし、この溶液にMA反応液を滴下し、-10°C付近に冷却後約30分間攪拌し、以後0~5°Cとして一夜攪拌した。反応液中のアミン成分の消失をTLCで確認した後、反応液を濃縮し、得られた残渣に酢酸エチル(AcOEt)を加え、有機相を10%クエン酸、5%重曹水、20%食塩水で順次洗浄した。次いで有機相をシリカゲルカラムで精製した後、石油エーテルで処理して結晶化させた。AcOEt-石油エーテルで再結晶を行い、結晶を濾取し、乾燥して目的化合物を得た。m.p. 150-153°C,  $[\alpha]_D = -17.28$  (C=1.0, MeOH)。元素分析、C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>として：実測値、C: 70.46, H: 6.43, N: 10.50 (理論

値、C: 70.57, H: 6.44, N: 10.73)。収率、20%。

##### (2) Boc-Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)の合成

Boc-Phe-NH-5-(Quinolyl) (1.0eq)にHCl/dioxane (20eq)を氷冷下で加え、攪拌して結晶を溶解させ、反応液中のBoc-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)をTLCでモニターしてその消失を確認した。ジエチルエーテルで結晶化し、結晶を分離後乾燥してPhe-NH-5-(Isoquinolyl)塩酸塩を得た。これとは別にBoc-Pro (1.0eq)をTHFに溶解し、NEt<sub>3</sub> (1.2eq)を加えて-10°Cまで冷却した後、BCF (1.1eq)を滴下し、-10°Cで30分間攪拌して混合酸無水物(MA)反応液とした。Phe-NH-5-(Isoquinolyl)塩酸塩をDMFに溶解し、NEt<sub>3</sub>を混合液の液性が塩基性となるまで加えて、-10°Cに氷冷した。アミン成分のDMF溶液にMA反応液を滴下し、-10°C付近で約30分間攪拌し、以後0~5°Cで一夜攪拌した。反応液中のアミン成分の消失をTLCで確認した後、反応液を濃縮し、得られた残渣に酢酸エチル(AcOEt)を加え、有機相を10%クエン酸、5%重曹水、20%食塩水で順次洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、得られた残渣を石油エーテルで処理することにより結晶化させた。AcOEt-石油エーテルで再結晶を行い、結晶を分離後乾燥して目的化合物を得た。m.p. 90-95°C,  $[\alpha]_D = -69.39$  (C=1.0, MeOH)。元素分析、C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>として：実測値、C: 68.53, H: 6.30, N: 11.17 (理論値、C: 68.83, H: 6.60, N: 11.47)。収率83%。

##### (3) Boc-Dmt-Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)の合成

Boc-Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl) (1.0eq)にHCl/dioxane (20eq)を氷冷下で加え、攪拌して結晶を溶解後、反応液中のBoc-Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)をTLCでモニターして、その消失を確認した。Et<sub>2</sub>Oで結晶化し、結晶を分離後乾燥してPro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)塩酸塩を得た。Boc-ジメチルチロシンヒドラジド(Boc-Dmt-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, 1.0eq)をDMFに溶解し、得られた溶液を-10~-15°Cに冷却し、HCl/dioxane (2.5eq)、亜硝酸イソアミル(1.2eq)を加えた。ヒドラジン試薬を用いてTLCでヒドラジドの消失を確認するまで-10~-15°Cで攪拌を継続し、消失確認後NEt<sub>3</sub> (2.5eq)を加えた。Pro-Phe-NH-5-(Isoquinolyl)塩酸塩 (1.0eq)をDMFに懸濁し、NEt<sub>3</sub>を液性が塩基性になるまで加え、得られたDMF溶液を-10~-15°Cに冷却した後、アジド反応液を滴下し、0~5°Cで攪拌を継続した。TLCで反応の進行を確認した後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣にAcOEtを加え、有機相を10%クエン酸、5%重曹水、20%食塩水で順次洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、得られた残渣を石油エーテルで処理して結晶化し、次いでAcOEt/石油エーテルから再結晶した。結晶を分離後乾燥して、目的化合物を得た。m.p., 140-142°C,  $[\alpha]_D = -46.89$  (C=1.0, MeOH)

元素分析、C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>・H<sub>2</sub>Oとして：実測値、C: 67.32, H: 6.57, N: 10.18 (理論値、C: 67.12, H: 6.08, N: 10.04)。収率50%。

(4) Dmt-Pro-Phe-NH-NH-3-(Quinolyl)塩酸塩の合成  
Boc-Dmt-Pro-Phe- NH-5-(Isoquinolyl) (1.0eq)にHCl/dioxane (20eq)を氷冷下に加え、攪拌して結晶を溶解後、反応液中のBoc-Dmt-Pro-Phe- NH-5-(Isoquinolyl)の消失をTLCで確認した。ジエチルエーテル(Et<sub>2</sub>O)で結晶化し、結晶を分離後乾燥してDmt-Pro-Phe- NH-5-(Isoquinolyl)塩酸塩を得た。

アミノ酸分析値：Dmt: 0.46, Pro: 0.72, Phe: 0.52  
MS, C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> として：理論値、579.70。実測値、579.97

#### 実施例3

Dmt-Pro-Phe-NH-8-(Quinolyl) (Sample No. MT-450)の合成

3-キノリルアミンの代わりに8-キノリルアミンを用いた以外は実施例1において記載した方法を繰り返して、Dmt-Pro-Phe-NH-8-(Quinolyl)の合成を行った。以下にその分析値を合成中間体の数値と共に示す。

##### (1) Boc-Phe-NH-8-(Quinolyl)の合成

m. p. 130-131°C, [α]<sub>D</sub>=-48.35 (C=1.0, MeOH)  
元素分析、C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>として：実測値、C: 70.65, H: 6.45, N: 10.59 (理論値、C: 70.57, H: 6.44, N: 10.74)。収率、65%。

##### (2) Boc-Pro-Phe-NH-8-(Quinolyl)の合成

m. p. —(オイル状), [α]<sub>D</sub>=-78.81 (C=1.0, MeOH)。  
元素分析、C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>として：実測値、C: 68.53, H: 6.30, N: 11.17 (理論値、C: 68.83, H: 6.60, N: 11.47)。オイル状のため収率を100%と仮定して次工程にそのまま使用した。

##### (3) Boc-Dmt-Pro-Phe-NH-8-(Quinolyl)の合成

m. p., 127-130°C, [α]<sub>D</sub>=-18.62 (C=1.0, MeOH)  
元素分析、C<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>として：実測値、C: 68.60, H: 6.37, N: 10.00 (理論値、C: 68.90%, H: 6.37%, N: 10.30%)。収率、78%。

##### (4) Dmt-Pro-Phe-NH-8-(Quinolyl)塩酸塩の合成

アミノ酸分析値：Dmt: 0.50, Pro: 0.77, Phe: 0.64  
MS, C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> として：理論値、579.70。実測値、579.70

なお上記ペプチド誘導体合成においては、融点測定器として柳本製作所製融点測定器を使用した；旋光度は、日本分光 DIP-1000を用いて25°Cで測定を行った；アミノ

酸分析器協和として協和精密(株)製 K-101ASアミノ酸分析器を使用した；マスペクトルは、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型計測質量分析装置(MALDI TOF-MS)を使用した。

#### 実施例4：

一般式(I)で表されるペプチド誘導体のオピオイドレセプター親和性の測定

実施例1ないし3において合成したペプチド誘導体について、公知の方法に従って、μおよびδ-オピオイドレセプター親和性をラット脳組織から得たシナプス膜分画を用いた競争的レセプターアッセイにより求めた。即ち、平均体重が300-350gであるSprague-Dawleyラットを断首して致死させた後、小脳を除去した脳組織を50 μg/mL soybean trypsin inhibitorを含む0.32M sucrose, 10mM HEPES (pH 7.5) でホモジナイズし、分画遠沈してシナプス膜分画 (P2分画) を得、これから内在性リガンドを除去するため 100mM NaCl, 0.1mM GMP, soybean trypsin inhibitorを含む50mM HEPES (pH 7.5) でプレインキュベートした。μ-オピオイドレセプターアゴニストであるトリチウム標識化[<sup>3</sup>H]DAGOおよびδ-オピオイドレセプター選択性の高いトリチウム標識化[<sup>3</sup>H]DPDPEをそれぞれ放射性リガンドとして使用し、該シナプス膜の一部を被験ペプチド誘導体と共に一定時間インキュベートすることによって、シナプス膜分画に対する放射性リガンドと被験ペプチド誘導体との交換結合反応に基づく競争的レセプター結合アッセイ (Radiolabeled receptor assay; RRA) を行った。この際目的リガンドとの交換反応を一定条件下の下で行った後、シナプス膜分画に残存する放射線量を測定し、シナプス膜分画に吸着したリガンド量を算出するのであるが、放射標識リガンドと目的リガンドとの間で競合してレセプターとの結合が起こるものと仮定し、放射性リガンドの最大特異的結合を50%阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) を求め、これから親和性結合定数 (Affinity constant (K<sub>i</sub>)) をChengらの方法 (Y. Cheng, Biochem. Pharmacol., 22, 3099 (1973)) により算出した。本発明のペプチド誘導体について得られた結果を下記表に示す (参考物質として、H-Dmt-Pro-Phe-NH-(1)-naphthyl (Sample No. MT-428)の結果を併記する)：

表1：Dmt-Pro-Phe-NH-Xのμ、δレセプターに対する親和性と選択性

	Receptor binding K <sub>i</sub> (nM)		Binding selectivity	
	μ	δ	δ/μ	
H-Dmt-Pro-Phe-NH-(1)-(Naphthyl)	0.293±0.037 (4)	19.86±3.0 (4)	68	
H-Dmt-Pro-Phe-NH-(3)-(Q)	0.328±0.017	190.37±22.	580	

uinolyl)	(4)	2(3)
H-Dmt-Pro-Phe-NH-(8)-(Q	0.486±0.051	33.14±1.71 68
uinolyl)	(5)	(4)
H-Dmt-Pro-Phe-NH-(5)-(I	0.190±0.018	98.33±8.83 517
soquinolyl)	(5)	(4)

本発明のペプチド誘導体は、 $\mu$ レセプターに対して0.19~0.48nMと非常に低い濃度で親和性を有することが確認された。

#### 実施例 5:

#### 各種オピオイドレセプターに対するアゴニスト・アンタゴニスト活性の測定

モルモット回腸(GPI)およびマウス輸精管(MVD)を用い、オピオイド化合物のアゴニスト・アンタゴニスト活性に関するアッセイ試験を行った。即ち、体重が300g前後の雄性モルモットを放血死体させて、回盲結合部位に直近の回腸から長さ10cm程度の回腸片を摘出し、36°Cに定温保持したKrebs等張液を満たしたマグヌス管内に、アイソトニックトランスデューサーにより1gの静止張力をかけた状態で載置し、次いで酸素通気処理(95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>)を行った。次いで30Vで0.5 msecの電気刺激を与えてモルモット回腸縦走筋を収縮させ、収縮が安定した後ペプチダーゼインヒビターを添加し、本発明の被験ペプチド誘導体を加えて、モルモット回腸縦走筋の電気収縮の

変化増幅器と記録計とに接続した GrassFT0.3トランスデューサーによってモニターした。オピオイド活性は、被験ペプチド誘導体添加後の収縮抑制とナロキソン添加による収縮抑制解除とによって判定した。なお、モルモット回腸縦走筋の電気収縮を50%抑制する濃度を測定し、これをIC<sub>50</sub>とした。またマウスMVD アッセイにおいて、モルモット回腸の代わりにマウス輸精管を用いて同様の操作を行い、マウス輸精管の電気収縮を50%抑制する濃度IC<sub>50</sub>を測定した。なおGPIアッセイにおいては、オピオイド作用は主として $\mu$ -オピオイド受容体によって仲介され、一方MVDアッセイにおいては、電気収縮の阻害は $\delta$ -オピオイド受容体との相互作用によることが明らかにされているので、それぞれの電気収縮を50%抑制する濃度IC<sub>50</sub>は、アゴニスト効力であるものとみなした。本発明のペプチド誘導体について得られた結果を下記表に示す(参考物質として、Sample No. MT-428の結果を併記する)：

表2: Dmt-Pro-Phe-NH-Xの $\mu$ 、 $\delta$ レセプターに対するアゴニスト・アンタゴニスト活性

SamplePeptides	GPI asaay MVD asaay pA2valu		
	IC <sub>50</sub> ± S. E. (nM)	IC <sub>50</sub> ± S. E. (nM)	e vs DA DLE
MT-428Dmt-Pro-Phe-NH-(Naphthyl)	0.494±0.183	5.47±1.01	—
MT-343Dmt-Pro-Phe-NH-(3)-(Quinolyl)	9.14±0.81	>10000	6.01
MT-450Dmt-Pro-Phe-NH-(8)-(Quinolyl)	44.5±11.0	2981±685	5.87
MT-454Dmt-Pro-Phe-NH-(5)-(Isoquinolyl)	0.939±0.112	>10000	6.14

なお、MVDアッセイにおいては、[D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] enkephalin (DADLE)をアゴニストに用い、そのIC<sub>50</sub>値を2倍にするに要するサンプル濃度のマイナスlog値をPA2 valueとして示した。Sample Nos. MT-343やMT-454は、 $\mu$ レセプターに親和性を有して作用を発現する、すなわちアゴニストとして働くのに対して比較的強い $\delta$ レセプターアンタゴニストであることは明らかである。

#### 実施例 6:

#### 動物実験による鎮痛効果

H. Takagiら (European J. of Pharmacol., 56 (1979) 205-208) のマウス大槽内注射法によって、本発明のオピオイドペプチド誘導体のそれぞれを生理食塩水に溶解した溶液を10 $\mu$ l/マウスの用量でマウス大槽内(i. c. v.)に投与し、次いでH. TakagiらのTail-pressure法に従って、投与処置したマウス尾根部に圧力測定装置(UGO BASILE社製)を用いて加圧し、その圧力を徐々に高めて、マウスがもがき反応を起こす時の閾値圧を測定した。なおマウスは一群五匹とし、陽性対照薬として塩酸モルヒネ

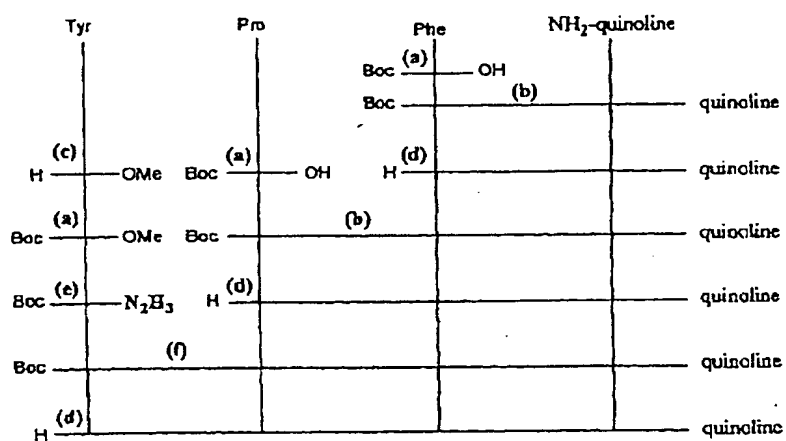


を用いた大槽内投与直後に回転運動を示したマウスは解析から除外した。実験結果を閾値圧の時間経過のグラフとして図2に示す(参考物質として、Sample No. MT-428の結果を併記する)が、これらのグラフから、本発明のオピオイドペプチド誘導体は、 $10 \mu\text{g}$ /マウスの用量

で投与した場合、優れた鎮痛効果を発揮し、特にSample Nos. 450および454は、鎮痛効果の発現が早いだけでなく持続性でも用量  $1 \mu\text{g}$ /マウスの塩酸モルヒネに匹敵することが判る。

【図1】

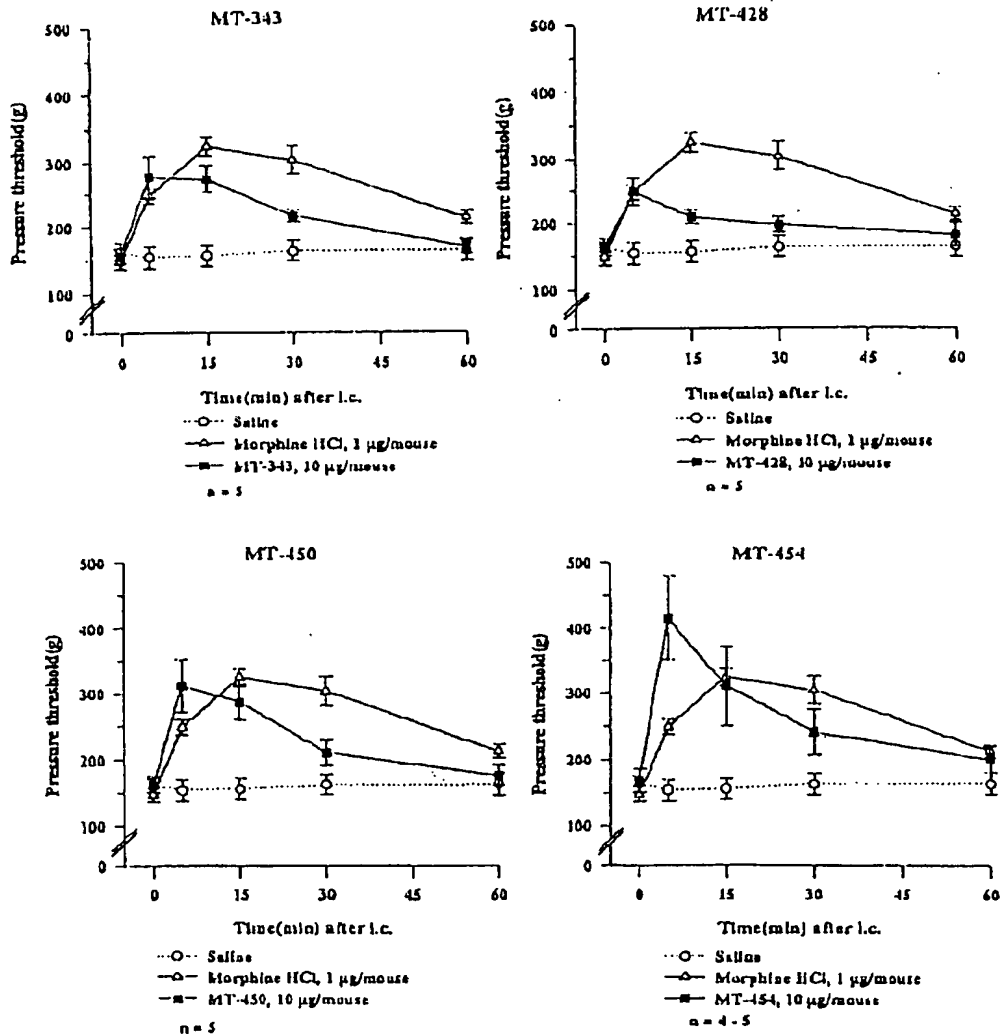
Tyr-Pro-Phe-NH-(キノリン)の液相合成スキーム



Reagents: (a) (Boc)<sub>2</sub>O (b) Isobutyl chloroformate (c) SOCl<sub>2</sub>, MeOH (d) HCl / dioxane  
 (e) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (f) HCl / dioxane, Isoamyl nitrite

【図2】

Anti-nociceptive effects of MT-series compounds after i.c. administration in the tail pressure test in mice



## 【手続補正書】

【提出日】平成11年12月28日（1999. 12. 28）

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】追加

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】チロシン、プロリン、フェニルアラニン及びキノリルアミンを出発物質として用いて液相法でTyr-Pro-

Phe-(QuinolyI)を合成する手法を示す簡略図である。即ち本図においては、先ずフェニルアラニンのアミノ基をt-ブトキシカルボニルで保護した後、クロロ蠟酸イソブチルを用いてキノリルアミンとカップリングさせ、その後希塩酸で脱保護反応を行なってH-Phe-NH-(QuinolyI)を得る。次にプロリンのアミノ基を同様にt-ブトキシカルボニルで保護した後、クロロ蠟酸イソブチルを用いて前記H-Phe-NH-(QuinolyI)とカップリングさせ、その後希塩酸を用いて脱保護反応を行なってH-Pro-Phe-NH-(QuinolyI)を得る。次いでチロシンのカルボキシル基をメタ

ノールとの反応でエステル化し、またアミノ基をt-ブトキシカルボニルで保護した後ヒドラジンと反応させてエステル基をヒドラジドとし、前記H-Pro-Phe-NH-(Quinoly)とカップリングさせてTyr-Pro-Phe-(Quinoly)が得られる。

【図2】実施例6に記載したように、試験物質を10 $\mu$ g/マウスの用量でマウス大槽内に注入投与して行なったTail-pressureによる鎮痛効果試験において、本発明に従

ったオピオイドペプチド誘導体であるSample Nos. MT-428, MT-450及びMT-454並びに参考物質であるMT-424について得られた疼痛刺激による侵害受容閾値圧の経時変化を黒塗りの四角で示す。なお、鎮痛試験においては生理食塩水及び1 $\mu$ g/マウス用量の塩酸モルヒネをそれぞれ対照及び陽性対照として用いたが、閾値圧の経時変化をそれぞれ記号○と記号△で示してある。

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA08 BA15  
CA59 DB04 DB75 MA52 MA56  
MA60 MA66 ZA082 ZC412  
4H045 AA10 BA11 BA12 DA50 EA21  
FA33 FA42 GA40 HA02